

学位の審査結果の要旨

申請者氏名 松村 望

横浜市立大学 大学院医学研究科 視覚再生外科学

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 伊藤 秀一 教授

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 西山 晃 准教授

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 山口 由衣 講師

学位論文名 : Cytokine profiles of tear fluid from patients with pediatric lacrimal duct obstruction

(小児涙道閉塞症患者における涙液中サイトカインの分析)

本論文は、片側性涙道閉塞の小児の両眼から涙液を採取し、涙液中に含まれるサイトカインの分析を行った研究である。涙液をシルマー試験紙にて採取した後に抽出し、フローサイトメーターを用いたマルチプルビーズアッセイ法にて7種類のサイトカイン（インターロイキン（以下 IL）-2, -4, -6, -10, 腫瘍壊死因子（以下 TNF）, インターフェロン（以下 IFN）- γ , IL-17A）の分析を行った。その結果、健常眼と比べて IL-6 のみが有意に上昇していた。また、Receiver operating characteristic curves（ROC 曲線）を用いた解析では、ROC 曲線下面積（area under the curve : AUC）は 0.99（95%信頼域 0.968–1）であり、カットオフ値を 129.88 pg/mL としたとき、感度 92.9%、特異度 100.0%と高く、涙液中 IL-6 濃度は小児涙道閉塞症の診断に有用であると考えられた。術後は全症例で治癒したが、涙液中 IL-6 濃度は術後に有意に減少していた。これらのことから、涙液中 IL-6 は小児の涙道閉塞症におけるバイオマーカーとなり得ると考えられた。

審査にあたり以上のような論文内容の説明が行われた後、以下のような質疑応答が行われた。

まず山口由衣副査より以下の質問がなされた。

1. IL-6 濃度のレンジが幅広いが、患者の臨床像と照らし合わせて、症状との相関などがみられていたか。
2. IL-6 の濃度が極めて高い印象であるが、涙道内視鏡の所見などで、涙道内に高度の炎症所見などがみられるものであるか。
3. 小児の涙道閉塞は線維化所見が主な所見であるか。
4. IL-6 の濃度の高い症例と低い症例で、涙道狭窄と涙道閉塞など、閉塞状態の違いがみられるか。
5. 涙液中サイトカインの由来に関して、涙道閉塞やそれ以外の疾患に関しての報告は過去にみられるか。
6. 術後に、ステロイド点眼を使用したことが結果に与えた影響は考えられるか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1. 今回の論文には掲載していない参考データではあるが、罹病期間と涙液中 IL-6 濃度との有意な相関がみられていた。罹病期間が長くなると涙液中 IL-6 濃度が高くなることから、治療時期の検討に結び付けられる可能性があると考えられた。
2. 粘膜の充血、多量の眼脂などが見られるが、重篤な発赤腫脹などはあまり見られないことが多い。しかし、長期間持続した涙道閉塞は、涙道内の線維化所見が見られることがあり、涙液中の高濃度 IL-6 の影響である可能性が考えられる。
3. 先天鼻涙管閉塞の基本は鼻涙管下端の先天的な膜状閉鎖であるが、長期化した症例などでは線維化所見がみられることがある。
4. 今回の論文では閉塞症例のみを検討しているが、同時に狭窄症例の検討も行った。症例数が少なかったので統計解析はできなかったが、狭窄症例は極めて低い IL-6 濃度であったことから、涙液中 IL-6 濃度の測定によって、涙道が閉塞しているのか狭窄しているのかの違いを診断できる可能性があると考えられる。
5. 角膜炎は角膜上皮の由来である場合や、結膜炎は結膜の粘膜上皮の由来である場合が報告されている。涙道は眼表面と異なり、直接的な組織の採取が困難な場所であることから、調べられていない。眼表面や眼周囲は組織を採取しづらい場所であるために、組織学的検討には限界があるが、今後の課題と考えらえる。
6. 術後 1 週間のステロイド点眼を使用した後に中止し、1 ヶ月後に涙液を採取しているため、術後涙液に関してステロイド点眼の影響はなかったものと考えられる。

次に、西山晃副査より以下の質問がなされた。

1. IL-6 の産生由来に関して、成人の涙道閉塞において免疫組織学的な検討がなされた報告などはないか。
2. 免疫組織学的な検討を行う方法や可能性はあるか。
3. 涙液中の白血球は主にどこに由来すると考えられるか。
4. 涙道閉塞症例と涙道狭窄症例に臨床的な違いはあるか。涙道狭窄症例であっても膿などの分泌物はみられるものか。涙液中 IL-6 濃度の差が閉塞と狭窄の鑑別に役立つと考えられるか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1. ヒトの涙液中サイトカイン濃度測定に関しては、過去に 1 編しか報告がなく、免疫組織学的な考察は行われていなかった。成人の涙道閉塞は原発性涙道閉塞が多く閉塞の原因は明らかでないが、慢性炎症の持続が閉塞の主な原因とされており、小児の涙道閉塞とは閉塞の原因が異なる可能性が高く、上昇しているサイトカインの違いや由来

も異なる可能性が高いと考えられる。

2. 涙嚢鼻腔吻合術の際には、涙道粘膜や涙道組織を切開することから、この際に得られた検体を用いて免疫蛍光染色を行うなどの更なる研究は可能であり、今後の検討課題としたい。
3. 涙液中の白血球は、涙液、涙道粘膜、眼関連粘膜免疫などに由来すると思われる。特定するにはやはり、免疫組織学的な検討が必要と考えられる。
4. 注意深い問診や発症時期の違い（狭窄の場合は先天的ではない場合も多い）から閉塞と狭窄の違いを推定できる場合もあるが、通水試験や涙道内視鏡検査などの侵襲的な検査を行わなければ区別できない場合も多い。涙道狭窄であっても眼脂などはみられる場合が多く、非侵襲的な涙液採取によって閉塞と狭窄の区別がつくのであれば、手術適応を判断する際などに臨床上有用であると考えられる。

最後に、主査として以下の質問を行った。

1. IL-6 はどこから産生されていると考えられるか。また、涙道粘膜の免疫組織学的検討などは可能であるか。涙液中の細胞の検鏡などは行っていないか。
2. サイトカイン以外の IgA やリゾチームなど、他のたんぱく質の成分とサイトカインの関わりはどうか。また、好中球が IL-6 の由来である可能性が考えられるのであれば、G-CSF や IL-8 の上昇なども考えられるのではないか。
3. 涙嚢炎などの感染症を合併している場合、起因菌との関連はどうか。グラム陽性球菌（主にペプチドグリカン）、グラム陰性桿菌（主に LPS）など、細胞の刺激を起こす物質や Toll 様受容体の違いなどが起こりうると考えられるが、起因菌との関連はどのように考えられるか。また、薬剤耐性菌などに違いがあるか。
4. 涙道閉塞と涙道狭窄の割合はどれくらいか。これらを区別することは臨床における治療方針の違いにつながるか。
5. 極めて高い濃度の IL-6 が涙液から検出されているので、眼表面や眼瞼皮膚などに炎症症状を起こすものと思われるが、臨床的にも炎症を起こしているものであるか。
6. 皮膚におけるバリア機能の低下がアレルギーの感作の引き金となる経皮感作や、鼻腔などの経粘膜感作が、アレルギーの原因として注目されている。涙道粘膜に高濃度の IL-6 が持続的に存在することで涙道粘膜のバリア機能が低下し、経粘膜感作としてアレルギーの原因となる可能性は考えられるか。長期化した涙道閉塞の症例に関して、血中の IgE 濃度や RAST の検査などでアレルギーの割合が高い、アレルギーを有する症例が多い、などは考えられるか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1. 先天鼻涙管閉塞の小児の多くが涙嚢炎を合併しており、涙道内に多量に膿がみられることから、これらの白血球から IL-6 が産生されていた可能性がある。また、涙道の粘膜からも産生されていると考えられるが、涙道粘膜を直接採取することが困難なため、免疫組織学的検討は今回は行っていない。涙液のスメアを用いた免疫組織学的検討などを今後の検討課題としたい。
2. 今回は涙液採取以外の検査を行っていないが、リゾチーム、IgA、アルブミンなどが涙液中には多く含まれることがわかっている。IL-6 は抗体産生を誘導することから、IgA などを調べることで、IL-6 上昇の機序について、更に明らかになると考えられる。また、本研究では Th1、Th2、Th17 の各グループのサイトカインが合計 7 種類測定できるスクリーニングキットを用いたが、今回の結果に基づいて、次回は IL-6 に関連するサイトカインを中心に測定を行いたい。
3. 今回の研究ではサイトカイン以外の涙液に関連した検査を同時には行っていないが、過去の細菌学的な検討では、インフルエンザ桿菌や黄色ブドウ球菌など、涙嚢炎の際の起因菌には症例による違いがあり、MRSA のような薬剤耐性菌が検出される場合もあることがわかっている。これらが涙液中サイトカインの上昇や IL-6 濃度の多寡、涙嚢炎などの臨床症状の重症度、自然治癒率の違いなどに関連しているか、今後の検討課題としたい。
4. 涙道閉塞症状を呈する小児の場合、8 割程度は涙道閉塞があるが、2 割程度は涙道狭窄であり、その割合は月齢によっても変わる。狭窄の場合は閉塞と異なり、鼻炎や副鼻腔炎などの鼻腔内の問題に起因していて、薬物療法や耳鼻科による鼻内治療が有効であることが多く、また自然治癒率も高い。涙道狭窄の場合涙道閉塞より IL-6 が低い傾向がみられたことから、涙液中 IL-6 濃度の測定を行うことで、自然治癒しやすく外科的治療の必要ない症例を見極めることに役立つ可能性があると考えられる。
5. 涙道閉塞の小児においては、結膜炎や眼瞼炎などの合併はしばしばみられるものであり、その原因が IL-6 を中心とする涙液中サイトカインである可能性が考えられる。
6. 動物実験において、涙道粘膜に IL-6 を持続的に投与することで涙道粘膜のバリア機能が障害されたとする報告が、本論文の結果を受けて、最近発表された。このことから、涙道閉塞の長期持続は、涙液中 IL-6 の上昇を引き起こし、涙道粘膜のバリア機能を障害すると考えられる。アレルギーの原因となり得るかについての報告はまだないが、臨床的にはアトピー性皮膚炎やアレルギー症状を有する小児は多い印象があり、術前検査の際に同意を得てアレルギーについても調べるなど、今後の検討課題としたい。

その他幾つかの本研究に関する質問がなされたが、いずれにおいても適切な回答がなされた。

以上の審査の結果、小児涙道閉塞における涙液中サイトカインの測定を行った本研究は、

小児涙道閉塞の診断や評価に有用であることを示し、今後の涙道閉塞症における病態評価・治療評価の一助となるものと思われた。また、申請者は本学位論文の内容を中心に幅広い質問に的確に回答し、この課題について深い理解と洞察力を持っていると判断した。以上より本研究は博士（医学）の学位に値するものと判定された。